

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 3 月 7 日 (07.03.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/042016 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01) *C07H 21/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/094902

(22) 国际申请日: 2018 年 7 月 6 日 (06.07.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710766925.0 2017 年 8 月 31 日 (31.08.2017) CN

(71) 申请人: 深圳华大智造科技有限公司 (MGI
TECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳
市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2
楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 刘二凯 (LIU, Erkai); 中国广东省深圳市
盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083
(CN)。 章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳
市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083
(CN)。 陈奥 (CHEN, Ao); 中国广东省深圳市盐田
区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
徐崇钧 (XU, Chongjun); 中国广东省深圳市盐田区
北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW
OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号
万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: NUCLEIC ACID PROBE AND NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD

(54) 发明名称: 一种核酸探针以及一种核酸测序方法

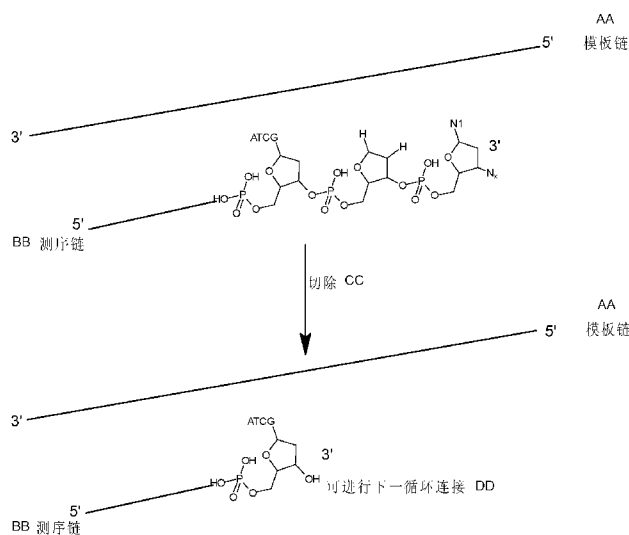


图1

AA Template strand
BB Sequencing strand
CC Excision
DD Ready for ligation in next cycle

(57) Abstract: A nucleic acid probe and a nucleic acid sequencing method for performing sequencing while ligating nucleic acids. The nucleic acid probe is a DNA sequencing probe, comprising a first moiety, a second moiety, a linker, and a detectable marker. A base of the first moiety is A, T, U, C, or G, a base of the second moiety is a random base and/or a universal base, and at least 3 bases are present in the second moiety. The first moiety and the second moiety are connected by means of the linker, the connection between the first moiety and the linker can be broken, and the detectable marker is attached to the second moiety or the linker. The above probe,

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则4.17(iii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

a combination formed therewith, or a sequencing method using the same can reduce the number or types of probes in nucleic acid sequencing, thereby reducing cost.

(57) 摘要: 核酸探针以及边连接边测序的核酸测序方法, 上述核酸探针为DNA测序探针, 其包含第一部分、第二部分、连接体和可检测的标记物, 第一部分的碱基为A、T、U、C或G, 第二部分的碱基为随机碱基和/或通用碱基, 并且至少为3个碱基, 第一部分和第二部分通过连接体连接, 并且第一部分和连接体之间的连接能够被切断, 可检测的标记物连接在第二部分或者连接体上。上述探针或将其组合或者测序方法能够降低测序中的探针数量或种类, 从而降低成本。

一种核酸探针以及一种核酸测序方法

技术领域

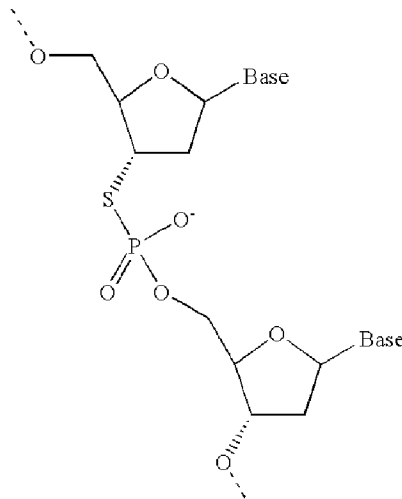
本发明属于基因测序领域，涉及一种核酸探针以及一种核酸测序方法。具体地，所述核酸探针为 DNA 测序探针。具体地，所述核酸测序方法为边连接边测序的核酸测序方法。

背景技术

连接法测序技术由 **Complete Genomics** 和 **ABI** 两家公司分别开发出来，采用不同的形式展现，基本原理都是通过连接酶连接上荧光修饰的 DNA 探针。该 DNA 探针在某些位置为特定碱基以识别待测序列，其余位置为随机序列可以和其它待测位置形成互补链。连接反应之后，去掉未连接的探针，之后通过光学手段检测连接上的探针信号而确定该位置的序列。

Complete Genomics 采用以不同的荧光基团分别标记 4 个不同碱基的探针。第一组探针的 5'端的第 1 个位置分别为 4 个不同的碱基，之后的碱基为随机序列从而可以结合到待测的随机序列上，通过连接酶连接到引物序列之后，检测荧光获得该位置的碱基信息。去掉加上的序列，加入新的测序引物之后进行第二组探针的杂交和连接，第二组探针的 5'端第 2 个位置分别为 4 个不同的碱基，其它位置为随机序列，在这之后进行检测第 2 个位置的荧光分子从而确定第 2 位置的序列。类似地，分别确定第 3—8 位置的碱基序列。一共使用 8 组探针，确定前八个碱基序列，之后加入更长的新的测序引物开展后面 8 个碱基的测序。

ABI 的连接测序法被称为 **Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection(SOLiD)**，采用 16 组不同的探针，每组探针的前面 2 个为固定序列，后面三个碱基为随机序列，之后三个碱基为通用碱基，在随机碱基和通用碱基（第 5 和第 6）连接的方法为 **O-P-S**，以上序列既可以从 5'端开始排序也可以从 3'端开始排序。如下面的式 I 所示，如果从 5'端排序，随机碱基 3'端为氧原子，第一个通用碱基 5'端为硫原子。从 3'端排序则相同，第 3 个随机碱基的 5'端为氧原子，第一个通用碱基的 3'端为硫原子。



式 I

测序从 3'端向 5'端方向，加上测序引物，使用测序探针连接检测，连接反应体系中，模板与引物互补配对，引物连接在磁珠上，直接进行拍照。用银离子切除（银离子可以特异性的和硫元素结合，从而切断 S-P 键，断裂之后 P 接氢氧离子，S 接上银离子），如此所有通用碱基被切掉，5'端方向留下磷酸基团，下一个循环连接在 5 个碱基后面的位置。多次重复之后，去掉测序链重新杂交新的引物，新的引物比之前多一个碱基，再重新循环多次之后，去掉测序链杂交第 3 次的引物。这样重复多次可以使整个序列连接起来，并通过信号的交叉对比，确定每个位置的序列信息。

DNA 连接反应测序法有如下几方面的不足：（1）探针数量或种类多，导致成本较高；（2）SOLiD 方法每次加入 5 个碱基，在一个循环或者几个循环之后要重新加载测序引物，增加测序成本和时间成本；（3）切除方法对测序体系并不友好。作为测序中的生化反应，很多酶对过渡金属非常敏感，另外，使用银离子容易有残留，难以避免对后续实验的影响，例如，反应的缓冲液中可能有氯离子，银离子易于与之生成沉淀；另外，银离子还可以和 T 碱基形成 T-Ag-T 结构的错误配对（mismatch）。

因此，尚需要开发新的测序方法，特别是新的效率更高、成本更低的边连接边测序的核酸测序方法。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，巧妙地设计了一种核酸探针，并在此基础上得到了利用该核酸探针进行核酸测序的方法。本发明人惊奇地发现，新的测序方法只用 4 组探针，显著降低了探针的数量从而能够有效地降低成本；本发明所设计

探针在每个循环之后只会增加测序链一个碱基，因此随着测序的不断延伸，不需要更换新的测序引物，也降低了成本。此外，本发明探针多余部分的切除使用新型的快速切除方法，减少了对测序体系的伤害，有利于提高测序的读长。由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种核酸探针，包含第一部分、第二部分、连接体（linker）和可检测的标记物，其中：

第一部分的碱基为 A、T、U、C 或 G，

第二部分的碱基为随机碱基和/或通用碱基，并且至少为 3 个碱基，

所述第一部分和第二部分通过连接体（linker）连接，并且第一部分和连接体之间的连接能够被切断，

所述可检测的标记物连接在第二部分或者连接体上。

本发明中，如果没有特别说明，

核酸探针也简称为探针。

本发明中，所称第一部分和第二部分仅仅是为了指代清楚，并不具有次序的含义。

本发明中，所述第一部分为测序碱基。

在本发明的一个实施方案中，其中，所述第一部分位于 5'端或 3'端；优选地，所述第一部分位于 5'端。如果探针 3'端第一个碱基为测序碱基，则可以把可检测的标记物和/或所述化学基团设计在 5'端；反之，如果 5'端第一个碱基为测序碱基则可检测的标记物和/或所述化学基团在 3'端。

在本发明的一个实施方案中，其中，第二部分的碱基为随机碱基。

在本发明的一个实施方案中，其中，第二部分的碱基为通用碱基。

在本发明的一个实施方案中，其中，第二部分的碱基为随机碱基和通用碱基兼有之。

在本发明的一些实施方案中，其中，所述第二部分的碱基为 3—15 个碱基，优选为 5—12 个碱基，更优选为 5—10 碱基（例如 5、6、7、8、9 或 10 个碱基），特别优选为 6—9 个碱基。不拘于理论的限制，优选的探针长度考虑到探针与模板杂交的稳定性，以及合成探针的成本。

所述第二部分的末端是阻断的，是指第二部分末端没有游离的 3'-OH，因而不能够形成新的 3', 5'-磷酸二酯键，即不能够再连接其它探针。

在本发明的一个实施方案中，当第一部分和连接体之间的连接被切断时，第一部

分的 3'端 OH 或者 5'端磷酸基团暴露出来。

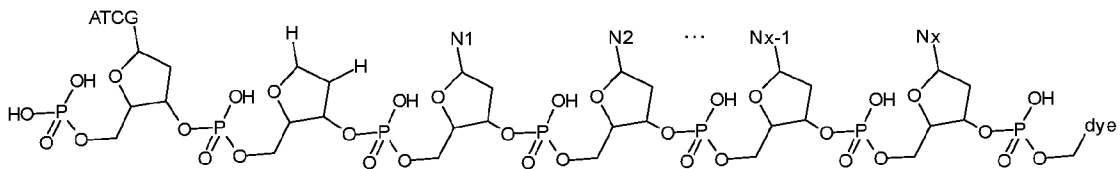
在本发明的一个实施方案中，当第一部分和连接体之间的连接被切断时，第二部分和连接体被切除。

在本发明的一个实施方案中，优选地，所述可检测的标记物连接在第二部分；

优选地，所述可检测的标记物连接在第二部分末端的 3'-OH 上；

优选地，所述可检测的标记物通过磷酸酯键连接在第二部分末端的 3'-OH 上。

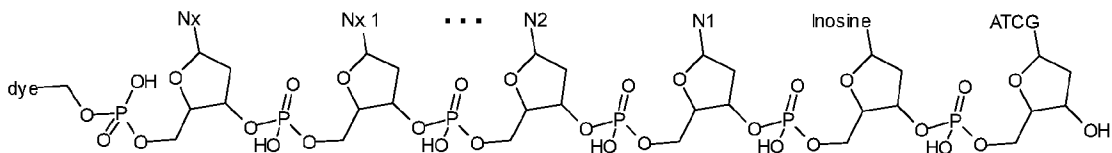
在本发明的一些实施方案中，其中，所述可检测的标记物为荧光基团，优选为选自 cy3、cy5、Texas Red、6-FAMTM、AF532、AF647 和 AF688 中的至少一种；优选地，所述荧光基团连接在第二部分末端的 3'-OH 上；优选地，所述荧光基团通过磷酸酯键连接在第二部分末端的 3'-OH 上。此时探针是阻断的。例如下面的式 II 或式 III 所示：



式 II

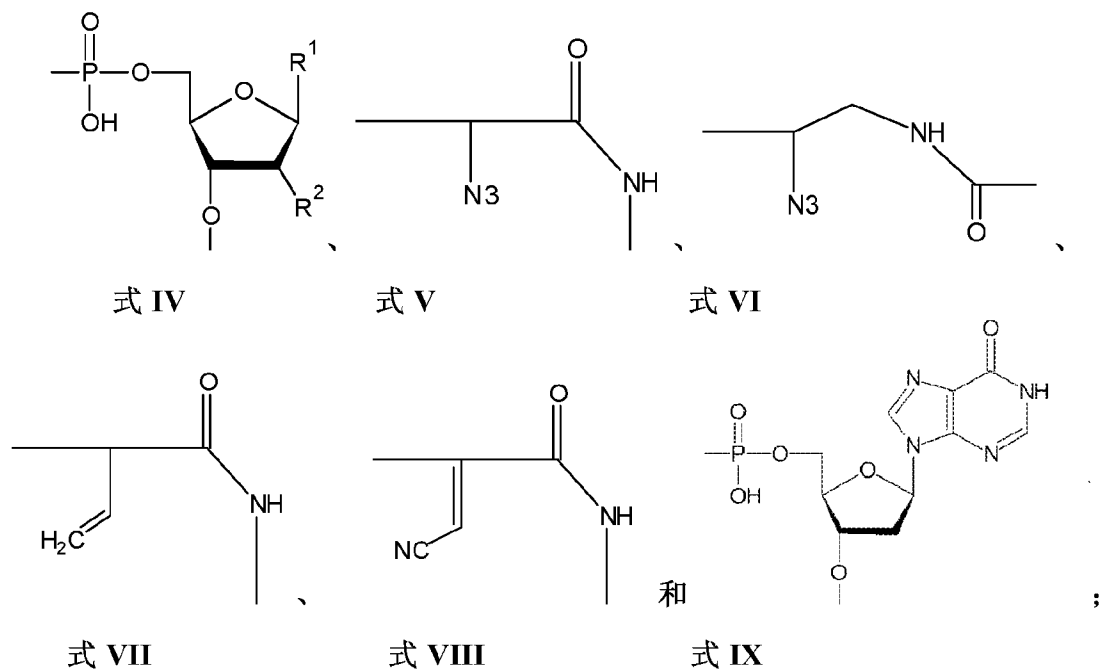
式 II 中，5'是测序碱基，3'是荧光基团。

下面的式 III 中，3'是测序碱基，5'为荧光基团。



式 III

第一部分和连接体之间的连接可以被不同的方式切断，从而使可以连接的 3'端 OH 或者 5'端磷酸基团露出来，以进行下一个循环的测序反应。优选地，所述连接体不含有硫原子；优选地，所述连接体选自如下的式 IV-式 IX 所示的基团：

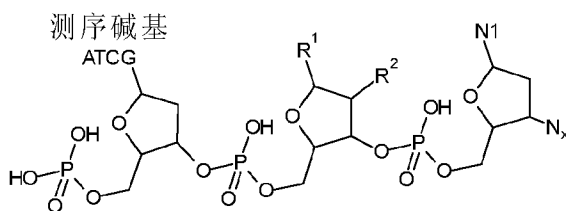


其中，式 IV 中， R^1 选自 H、OH、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基； R^2 选自 H、OH、F、Cl 和 Br。

上述式 IV-式 IX 所示的基团所代表的连接方式分别简称为 AP 位点、叠氮、叠氮、烯丙基、氰乙烯基和 inosine 位点。切除方式依次分别为 Endonuclease IV、有机膦化物、有机膦化物、钯催化试剂、有机膦化物和 hAAG 酶+endonuclease IV 酶。

上述式 IV-式 IX 所示的基团的连接和切除方法可以参考本领域技术人员知悉的方法，也可以参考下面的描述。

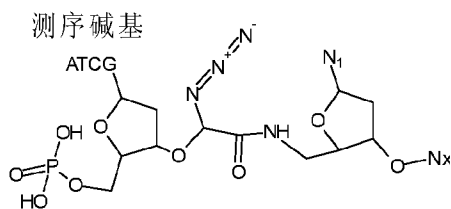
(1) AP 位点连接方式



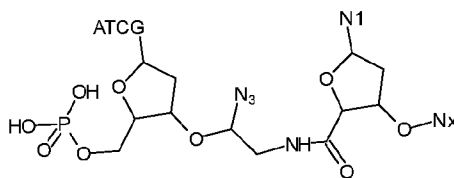
式 X

测序碱基和第二个碱基 (N1) 的连接采用一个环状脱氧核糖或脱氧核糖衍生物连接，具体连接方法可以参考 Xipeng Liu, Jianhua Liu. The mechanism of base excision repair in *Chlamydia pneumoniae*. DNA Repair 4 (2005) 1295-1305。上面的式 X 为 5'端测序碱基的结构式，其中 R^1 选自 H、OH、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基； R^2 选自 H、OH、F、Cl 和 Br。

(2) 两种叠氮连接方式



式 XI

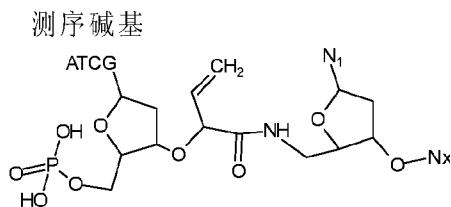


式 XII

式 XI 或式 XII 中化学基团与测序碱基的连接方法可以参考现有技术，例如美国专利 US8084590B2。

式 XI 或式 XII 中化学基团与测序碱基的连接可被有机膦化物(例如 THPP, TCEP)切除。切除的条件可以是，例如，100mM TCEP, pH=7, 1M 氯化钠, 50℃下 5 分钟。

(3) 烯丙基连接方式

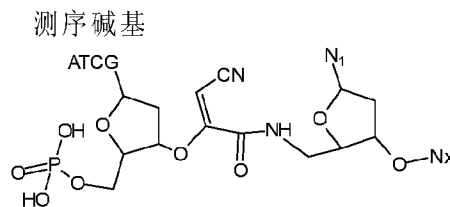


式 XIII

式 XIII 中化学基团与测序碱基的连接方法可以参考现有技术，例如 Jingyue Ju, Dae Hyun Kim, et.al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. PNAS. 2006. 103. 19635-19640。

式 XIII 中化学基团与测序碱基的连接可被 PdCl₂+磺化三苯基膦配合物切除。切除的操作条件可以是，例如，20mM Tris-HCl 10mM (NH₄)₂SO₄ 10mM KCl 2mM MgSO₄ 0.1% Triton® X-100 pH 8.8, 1mM Na₂PdCl₄, 5mM P(PhSO₃Na)₃ 反应 5 min 60℃。

(4) 氰乙基连接方式

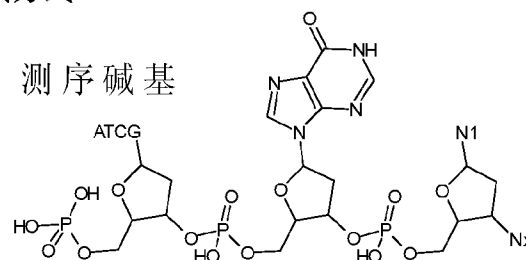


式 XIV

式 XIV 中化学基团与测序碱基的连接方法可以参考现有技术，例如 PNAS, 2006. 103, 19635-19640。

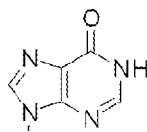
切除方法：100Mm THPP, pH 9, 3M NaCl, 0.2M tris。

(5) inosine 位点连接方式



式 XV

Inosine:



式 XV 中化学基团与测序碱基的连接方法可以参考现有技术，或者委托商业公司例如（生工生物工程(上海)股份有限公司）连接。

切除方法：50 mM KOOCCH₃, 20 mM Tris-Acetate, 10 mM Mg(OOCCH₃)₂, 1 mM DTT, 100 μg/mL BSA, 2 U/mL hAAG 酶+40U/ml endonuclease IV 酶。

本发明的另一方面涉及一种核酸探针组合，其包含 4 组探针，其中：

第一组核酸探针（简称为 A 探针或 A probe）：包含本发明中任一项所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 A；

第二组核酸探针（简称为 T 探针或 T probe）：包含本发明中任一项所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 T 或 U；

第三组核酸探针（简称为 C 探针或 C probe）：包含本发明中任一项所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 C；

第四组核酸探针（简称为 G 探针或 G probe）：包含本发明中任一项所述的核酸

探针，其中，第一部分的碱基为 G；

并且所述 4 组核酸探针中的可检测的标记物各不相同；

所述 4 组核酸探针混合或者不混合；

优选地，第一组核酸探针与第四组核酸探针的摩尔数相等；

优选地，第二组核酸探针与第三组核酸探针的摩尔数相等；

优选地，第一组核酸探针与第四组核酸探针的摩尔数之和小于或等于第二组核酸探针与第三组核酸探针的摩尔数之和。

不拘于理论的限制，A 探针与 G 探针更容易连接，优选 A 探针与 G 探针的摩尔数之和小于或等于 T 探针与 C 探针的摩尔数之和，有利于连接的平衡和效率。

优选地，A 探针：T 探针：C 探针：G 探针的摩尔比为 (0.5-2)：(2-5)：(2-5)：(0.5-2)；

优选地，A 探针：T 探针：C 探针：G 探针的摩尔比为 (0.8-1.5)：(2-5)：(2-5)：(0.8-1.5)；

优选地，A 探针：T 探针：C 探针：G 探针的摩尔比为 (0.8-1.5)：(3-5)：(3-5)：(0.8-1.5)；

优选地，A 探针：T 探针：C 探针：G 探针的摩尔比为 (0.5-2)：(3-5)：(3-5)：(0.5-2)；更优选为 1：4：4：1。

不拘于理论的限制，优选的 A 探针：T 探针：C 探针：G 探针的摩尔比有利于连接的平衡和效率。

本发明的另一方面涉及一种连接应液，其包含本发明中任一项所述的核酸探针，或者包含本发明的核酸探针组合，以及 DNA 连接酶。

在本发明的一个实施方案中，所述的连接液，其中，所述 DNA 连接酶为选自 T4 DNA 连接酶、T7 DNA 连接酶和 T3 DNA 连接酶中的一种或多种。

在本发明的一个实施方案中，所述的连接液，其中，所述核酸探针的浓度为 0.1 μ M—5 μ M，优选为 1 μ M。

在本发明的一个实施方案中，所述的连接液，其中，所述 DNA 连接酶的浓度为 0.01 μ M—2 μ M 或者 0.1 μ g/ml—20 μ g/ml，优选为 0.5 μ M。

在本发明的一个实施方案中，所述的连接液，其还包括如下成分：

50mM CH₃COOK, 20mM Tris, 10mM Mg(CH₃COO)₂, 100 μ g/ml BSA, 1mM ATP,

10% PEG6000;

优选地，所述连接液余量为水。

本发明的再一方面涉及一种试剂盒，其包含本发明中任一项所述的核酸探针，或者包含本发明的核酸探针组合，或者包含本发明的连接液；

优选地，还包含选自能够切断第一部分和连接体之间的连接的试剂、用于溶解核酸探针的缓冲液和测序引物中的一种或多种；

优选地，所述试剂盒中的试剂不含有银离子。

在本发明的一个实施方案中，所述的试剂盒，其中，所述DNA连接酶为选自T4 DNA连接酶、T7 DNA连接酶和T3 DNA连接酶中的一种或多种。

在本发明的一个实施方案中，所述的试剂盒，其中，能够切断第一部分和第二部分连接的试剂为内切酶（例如内切酶IV或内切酶V）、有机膦化物（例如THPP或TCEP）或者PdCl₂与磺化三苯基膦配合物的组合物。

本发明的再一方面涉及一种核酸测序方法，包括下述步骤：

（1）将测序引物杂交至待测核酸分子；

（2）将本发明所述的核酸探针或者本发明的核酸探针组合连接至测序引物；

（3）洗脱未与待测核酸分子结合的核酸探针；

（4）检测结合于待测核酸分子的核酸探针上的可检测的标记物，确定第一部分的碱基信息；

（5）切断核酸探针第一部分与连接体的连接，洗脱核酸探针中除第一部分之外的其余部分；

优选地，还包括下述步骤：

（6）重复前述步骤（2）—（4）或（2）—（5）。

在本发明的一个实施方案中，步骤（1）中所述待测核酸分子连接在固相支持物上。

所述固相支持物包括但不限于：芯片、槽道（Flowcell）、磁珠等。所述固相支持物上固定有接头序列，该接头序列与待测核酸分子能够结合。例如，当待测核酸分子是以DNA文库的形式时，该接头序列与构建文库的接头序列通过碱基配对结合。所述DNA文库的构建方法可以是本领域技术人员知悉的方法。

优选地，所述核酸测序方法还包括将连接在固相支持物上的待测核酸分子进行扩增的步骤。

不拘于理论的限制，扩增的目的是获得足够数量的样本，将碱基的信号强度放大，以达到测序所需的信号要求。扩增产物仍然连接在固相上，形成局部富集。

扩增的手段可以是聚合酶链式反应（PCR），例如通过乳液PCR（Emulsion PCR）或桥式PCR。所述乳液PCR可以参考，例如，ABI公司的Solid测序方法中的乳液PCR操作，或者参考Roche 454测序方法中的乳液PCR操作。所述桥式PCR可以参考illumina公司的Solexa测序方法中的桥式PCR操作。

在本发明的一个实施方案中，步骤（2）中，通过使用本发明的连接液，将本发明所述的核酸探针或者本发明的核酸探针组合连接至测序引物。步骤（1）中探针的连接和其它连接法测序一样，为通用的T4 DNA连接酶连接反应。

在本发明的一个实施方案中，步骤（3）中，洗脱所用的试剂可以是本领域技术人员知悉的试剂，例如5X SSC+0.05% tween20。

在本发明的一个实施方案中，步骤（5）中，洗脱所用的试剂可以是本领域技术人员知悉的试剂，例如5X SSC+0.05% tween20。

在本发明的一个实施方案中，步骤（5）中，切断核酸探针第一部分与连接体之间的连接之后，暴露出3'端OH，可进行下一循环连接测序（如图1所示）。

对于步骤（6）而言，通常情况下，重复前述步骤（1）—（5）；在已经完成一轮测序的情况下，可以仅重复前述步骤（1）—（4）。

本发明中，所述待测核酸分子可以是单链或双链的DNA分子，或者单链或双链的RNA分子。所述DNA分子可以是来自于动物、植物或者微生物的DNA分子。优选地，所述DNA分子是以DNA文库的形式，所述DNA文库可以是利用文库构建试剂盒构建的DNA文库。

本发明中，Nx是指有x个N碱基，x可以是正整数，例如3、4、5、6、7、8、9.....14、15等。

术语“随机碱基”是指该位置为4种碱基各占25%，

术语“通用碱基”是指该碱基可以和AGTC四种中的任何一个形成碱基配对结构。例如，5-硝基吡啶环、2-硝基吡咯环等。

术语“测序碱基”是指该位置的碱基为固定碱基，例如，如果该位置的碱基为T，

则该探针负责检测碱基 A。

在本发明中，术语“C₁-C₆ 烷基”是指具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、2-戊基、异戊基、新戊基、己基、2-己基、3-己基等；C₁-C₄ 烷基和 C₁-C₃ 烷基也可做类似理解。优选的烷基是 C₁-C₄ 烷基，更优选的烷基是 C₁-C₃ 烷基。

术语“C₂-C₆ 烯基”是指具有 2-6 个碳原子以及至少一个双键的烯基，并且包括乙烯基、丙烯基、1-丁-3-烯基、1-戊-3-烯基、1-己-5-烯基等；C₃-C₅ 烯基也可做类似理解。优选的是 C₃-C₅ 烯基。

术语“C₂-C₆ 炔基”是指具有 2-6 个碳原子以及至少一个叁键的炔基，并且包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔-2-基等；C₃-C₅ 炔基也可做类似理解。优选的是 C₃-C₅ 炔基。

发明的有益效果

本发明具有下述技术效果中的至少一项：

- (1) 本发明的探针或探针组合或者测序方法能够显著地降低测序中的探针数量或种类，从而显著降低了成本。
- (2) 由于一次加入一个碱基，不需要重复加引物，也降低了成本。
- (3) 本发明还采用了对测序反应体系友好的切除方法。
- (4) 本发明测序准确度高。
- (5) 本发明有利于提高测序的读长。

附图说明

图 1：含有 AP 位点的探针在内切酶 IV 作用下被去除的示意图。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

下面实施例所用的核酸探针可以按照本领域已知的方法合成，如果没有特别说

明，可以委托商业上的公司例如合亚医药科技（上海）有限公司或者生工生物工程（上海）股份有限公司代为合成。

实施例 1：AP 位点可逆连接探针（6 个随机碱基）的测序应用

1. 仪器和试剂

仪器基于 BGISEQ-500 平台。理论上，其它测序平台（例如 illumina 的 hiseq 平台等）经过适当调整，也可以进行与本实施例相同或类似的实验。

另外，为了能够在 BGISEQ-500 平台上使用，所选用的修饰染料与 BGISEQ-500 试剂所使用的染料吸收发射波长接近，因此可以很好的被 BGISEQ-500 光学系统检测。

本实验使用的部分试剂和 BGISEQ-500 完全一致，包括本实验所使用的拍照缓冲试剂、洗脱缓冲液 2。

本实验使用的部分试剂和 BGISEQ-500 不同，包括：用包含“本实施例的探针、酶和缓冲液”的连接液取代 BGISEQ-500 中的探针聚合反应液，用本实验的切除缓冲液取代 BGISEQ-500 的切除缓冲液。

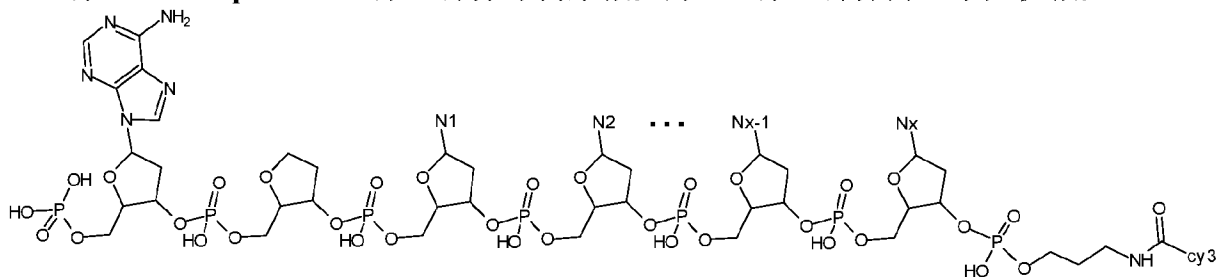
实验样品是大肠杆菌的基因组 DNA，其为 BGISEQ-500 所携带的标准样品。

根据制造商的说明书，采用 MGIEasy™ DNA 文库制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）以大肠杆菌标准菌株为原料提取 DNA 制备用于测序的文库，加载到测序芯片上。

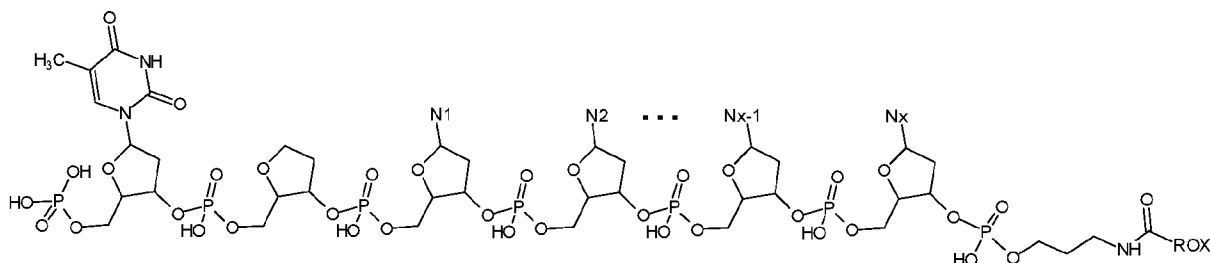
2. 探针的设计与合成

4 组 AP 位点可逆连接探针如下（x=6）：

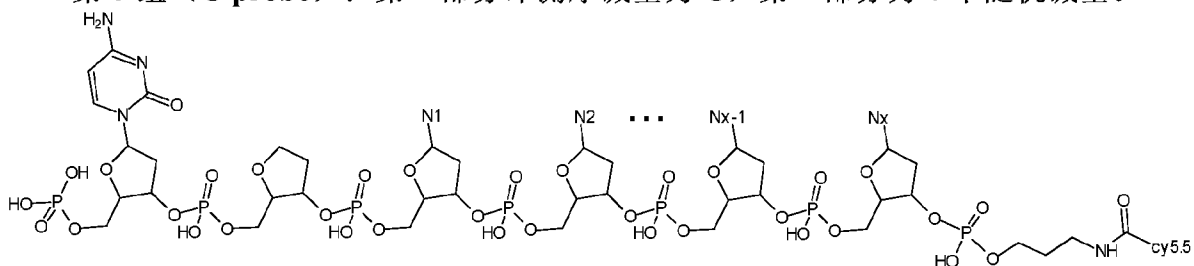
第 1 组（A probe）：第一部分即测序碱基为 A，第二部分为 6 个随机碱基。



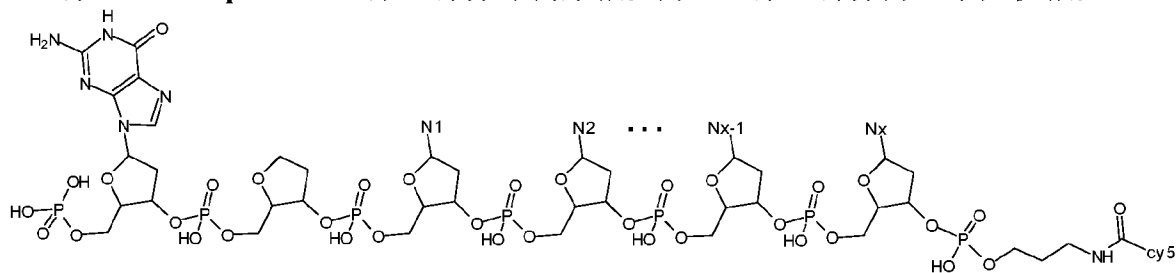
第 2 组（T probe）：第一部分即测序碱基为 T，第二部分为 6 个随机碱基。



第 3 组 (C probe)：第一部分即测序碱基为 C，第二部分为 6 个随机碱基。



第 4 组 (G probe)：第一部分即测序碱基为 G，第二部分为 6 个随机碱基。



以上探针委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

將以上 4 組探針和 T4 DNA 連接酶溶解在如下的緩沖液中：

50mM CH₃COOK, 20mM Tris, 10mM Mg(CH₃COO)₂, 100µg/ml BSA, 1mM ATP, 10% PEG6000。

得到连接液。

连接液中探针的浓度是 1 μ M，其中摩尔比 A probe: T probe: C probe: G probe 约为 1: 4: 4: 1。

连接液中 DNA 连接酶的浓度时 $0.5\mu\text{M}$ 。

3. 测序步骤

参照 **BGISEQ-500** 说明书完成如下的前期准备工作：文库构建，**DNA** 单链环扩增成 **DNA** 纳米球，**DNA** 纳米球装载至 **BGISEQ-500** 携带的芯片上和测序引物加载到 **DNA** 纳米球上。

利用仪器加入包含上述 4 种探针、T4 DNA 连接酶和缓冲液的连接液，在 25℃ 下

连接反应 30 分钟；

用洗脱试剂 2，洗脱未连接的探针；

然后加入拍照缓冲液进行图像采集（拍照）；利用软件分析每个 DNA 纳米球位点的碱基信息；

拍照之后加入内切酶 IV（New England Biolabs，货号 M0304L）和其缓冲液，在 37℃ 下反应 5 分钟，以切除 AP 位点，之后加入洗脱试剂 2 洗脱被切除的部分探针；可重复加入 4 组探针进行下一循环的测序。

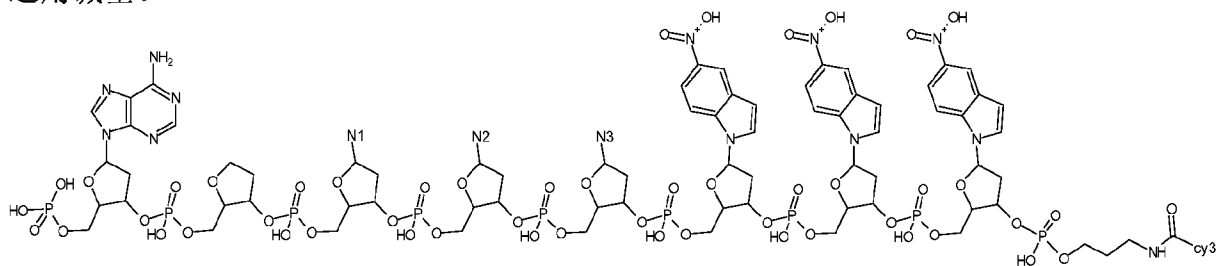
4. 实验结果

结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

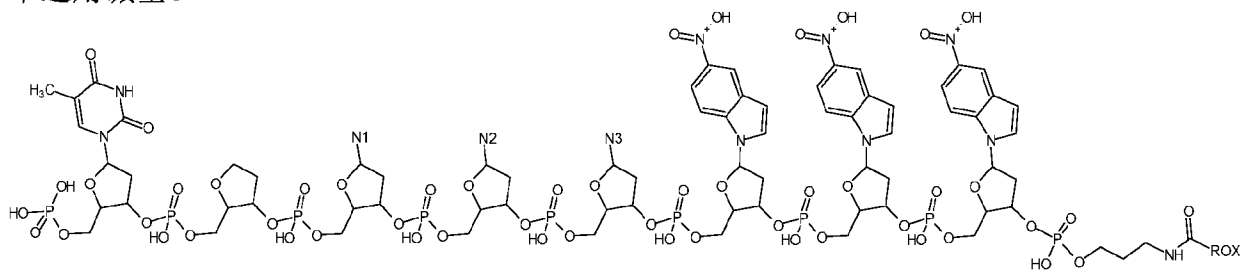
实施例 2：AP 位点可逆连接探针（3 个随机碱基+3 个通用碱基）的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于使用如下的 4 组探针：

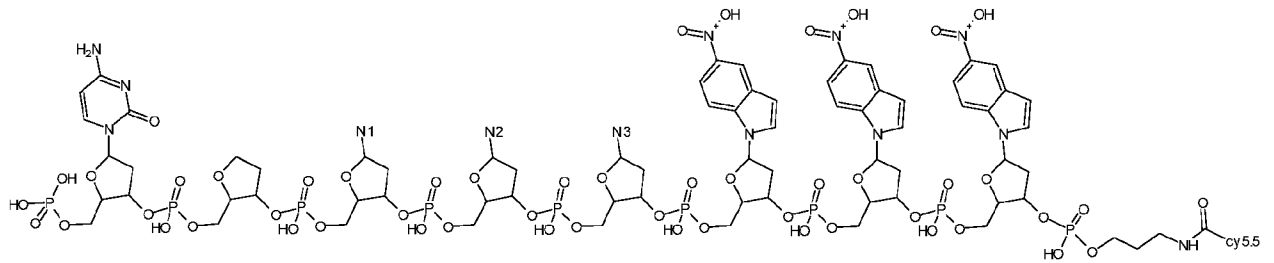
第 1 组（A probe）：第一部分即测序碱基为 A，第二部分为 3 个随机碱基+3 个通用碱基。



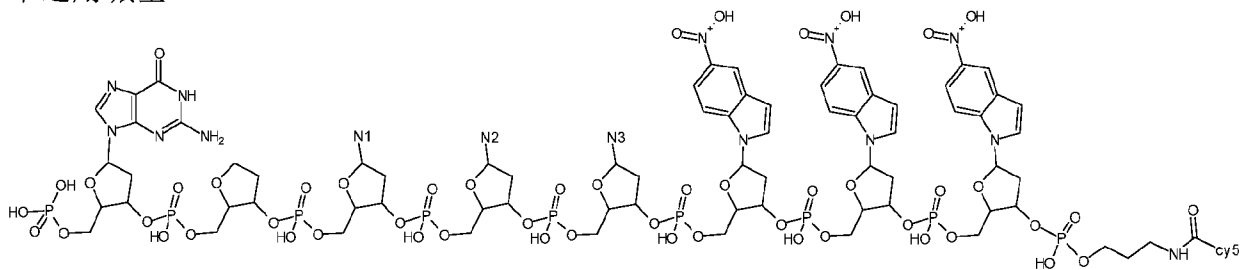
第 2 组（T probe）：第一部分即测序碱基为 T，第二部分为 3 个随机碱基+3 个通用碱基。



第 3 组（C probe）：第一部分即测序碱基为 C，第二部分为 3 个随机碱基+3 个通用碱基。



第 4 组 (G probe)：第一部分即测序碱基为 G，， 第二部分为 3 个随机碱基+3 个通用碱基。



结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

实施例 3：AP 位点可逆连接探针（7 个随机碱基）的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于使用的 4 组 AP 位点可逆连接探针，其中 $x=7$ 。

结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

实施例 4：AP 位点可逆连接探针（8 个随机碱基）的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于使用的 4 组 AP 位点可逆连接探针，其中 $x=8$ 。

结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

实施例 5：AP 位点可逆连接探针（9 个随机碱基）的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于使用的 4 组 AP 位点可逆连接探

针，其中 $x=9$ 。

结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

实施例 6：化学基团（叠氮）可逆连接探针（6 个随机碱基）的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于

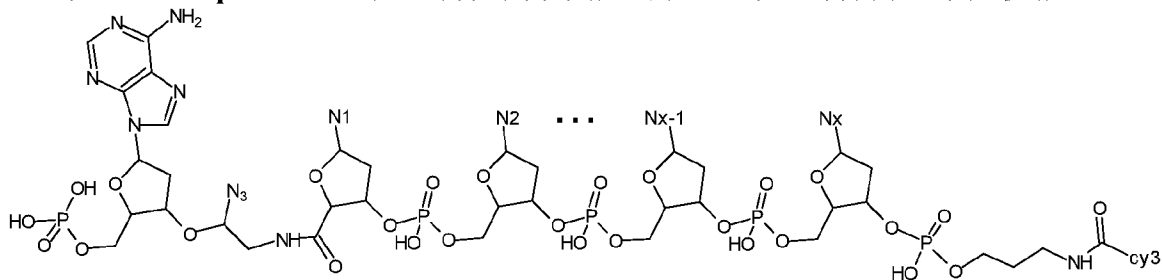
1. 仪器和试剂

与实施例 1 相同。

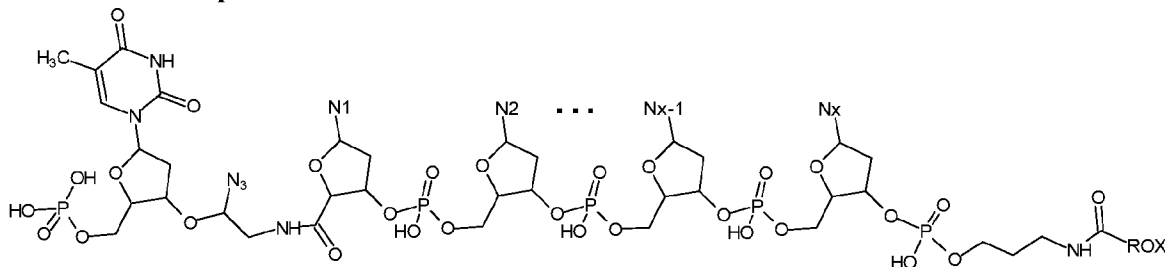
2. 探针的设计与合成

使用如下的 4 组探针，其中 $x=6$ ：

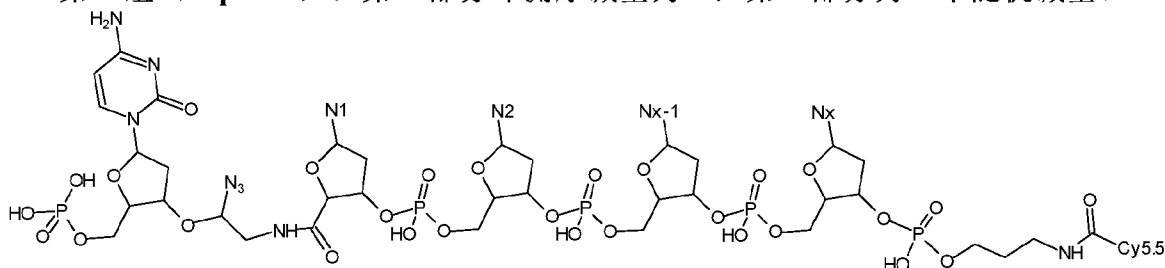
第 1 组（A probe）：第一部分即测序碱基为 A，第二部分为 6 个随机碱基。



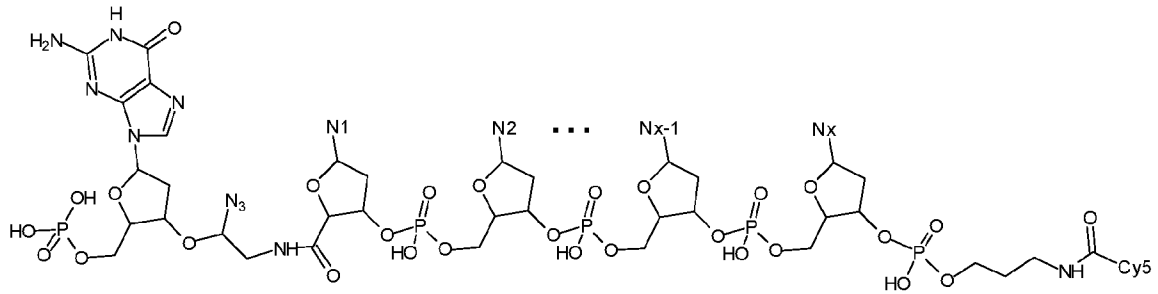
第 2 组（T probe）：第一部分即测序碱基为 T，第二部分为 6 个随机碱基。



第 3 组（C probe）：第一部分即测序碱基为 C，第二部分为 6 个随机碱基。



第 4 组（G probe）：第一部分即测序碱基为 G，第二部分为 6 个随机碱基。



将以上 4 组探针和 T4 DNA 连接酶溶解在如下的缓冲液中：

50mM CH₃COOK, 20mM Tris, 10mM Mg(CH₃COO)₂, 100μg/ml BSA, 1mM ATP, 10% PEG6000。

得到连接液。

连接液中探针的浓度是 1μM，其中摩尔比 A probe: T probe: C probe: G probe 约为 1: 4: 4: 1。

连接液中 T4 DNA 连接酶的浓度是 0.5μM。

3. 测序步骤

参照 BGISEQ-500 说明书完成如下的前期准备工作：文库构建，DNA 单链环扩增成 DNA 纳米球，DNA 纳米球装载至 BGISEQ-500 携带的芯片上和测序引物加载到 DNA 纳米球上。

利用仪器加入包含上述 4 种探针、T4 DNA 连接酶和缓冲液，在 25℃ 下连接反应 30 分钟；

用洗脱试剂 2，洗脱未连接的探针；

然后加入拍照缓冲液进行图像采集（拍照）；利用软件分析每个 DNA 纳米球位点的碱基信息；

拍照之后加入切除试剂，切除试剂成份为（10Mm THPP, 200Mm tris pH=9 缓冲液，0.5M 氯化钠），切除反应 60 度 3 分钟，之后加入洗脱试剂 2 洗脱被切除的部分探针；

可重复加入 4 组探针进行下一循环的测序。

4. 实验结果

由于大肠杆菌的基因组较小，本发明人在此进行了 30 个循环的测序，通过 BGISEQ-500 的测序分析软件进行了结果分析，结果如下面的表 1 所示。

表 1:

参考基因组 (Reference)	大肠杆菌
-------------------	------

循环数 (CycleNumber)	30
拍照区域 (区域数目)	1632 个
全部读数 (TotalReads)	352.89M
比对度数 (MappedReads)	293.01M
^a Q30	77.5%
滞后相 (Lag)	0.78%
超前相 (Runon)	0.39%
有效读数比例 (ESR)	80.73%
比对率 (MappingRate)	83.3%
^b 错误率	1.83%

a, Q30 表示碱基被测错的概率为 0.1%，即准确率为 99.9%；Q30 为 77.5%是指 77.5%的碱基响应 (base call) 的准确率达到 99.9%。

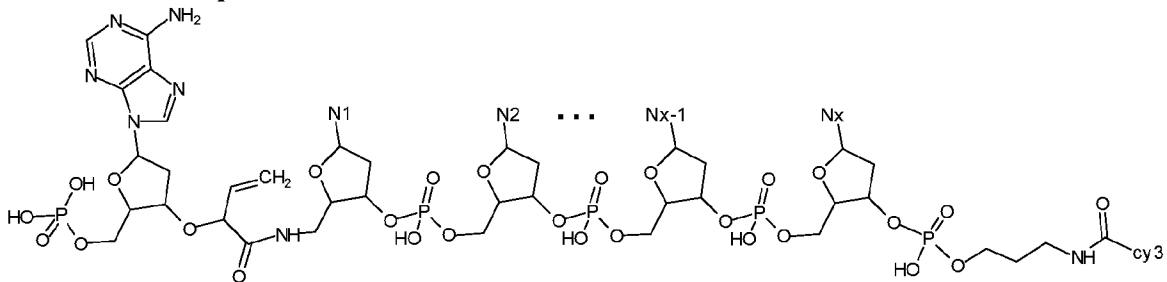
b, 是指平均错误率。

结果显示, 利用本发明的方法 Q30 达到 77.5%, 错误率只有 1.83%, 读长至少可达到 30 个碱基。另外, 由于探针的数量减少以及不需要更换新的引物, 发明的成本显著低于现有的连接测序法。

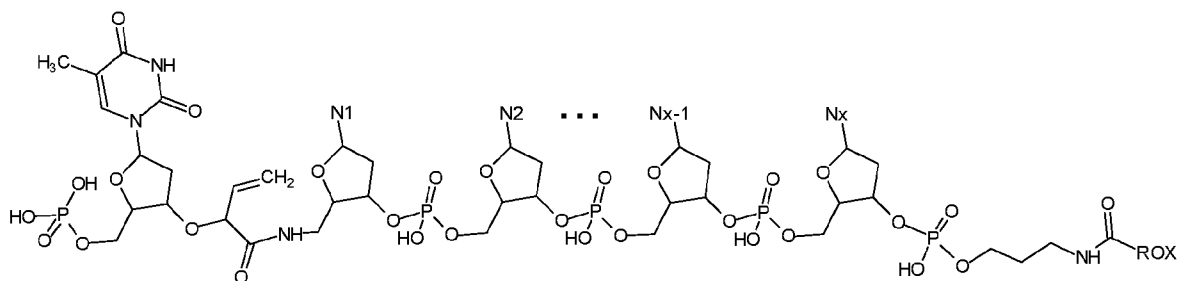
实施例 7: 化学基团 (烯丙基) 可逆连接探针 (6 个随机碱基) 的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行, 不同之处在于使用 4 组化学基团 (烯丙基) 可逆连接探针, 如下:

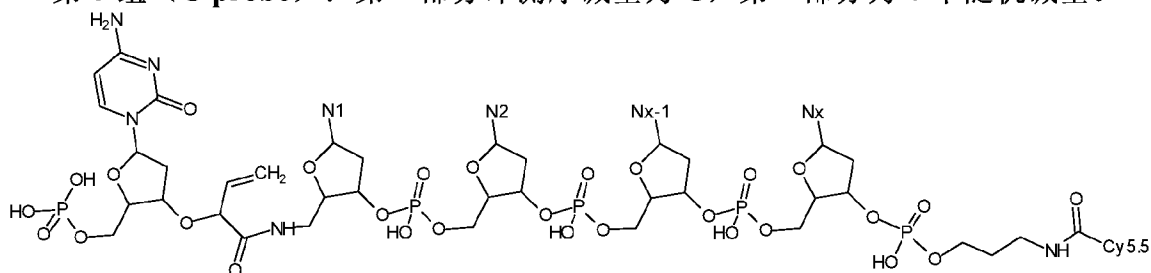
第 1 组 (A probe): 第一部分即测序碱基为 A, 第二部分为 6 个随机碱基。



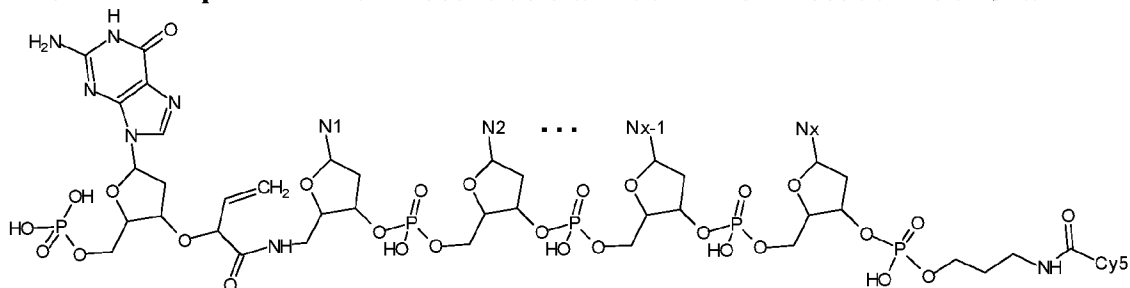
第 2 组 (T probe): 第一部分即测序碱基为 T, 第二部分为 6 个随机碱基。



第3组 (C probe)：第一部分即测序碱基为 C，第二部分为 6 个随机碱基。



第 4 组 (G probe)：第一部分即测序碱基为 G，第二部分为 6 个随机碱基。

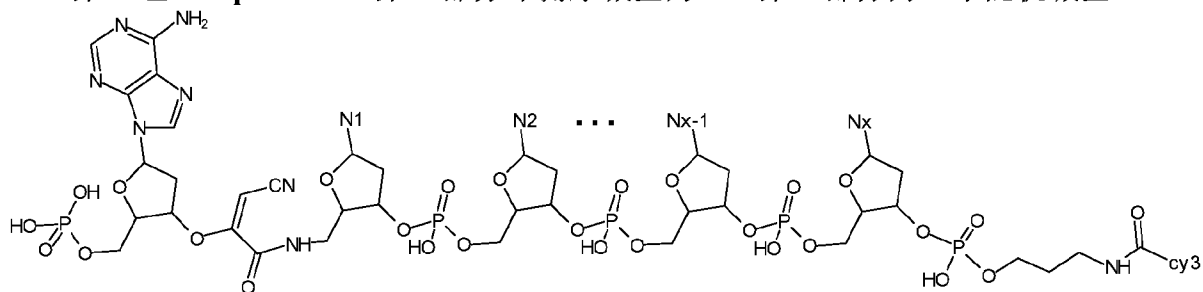


结果与 BGISEQ500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

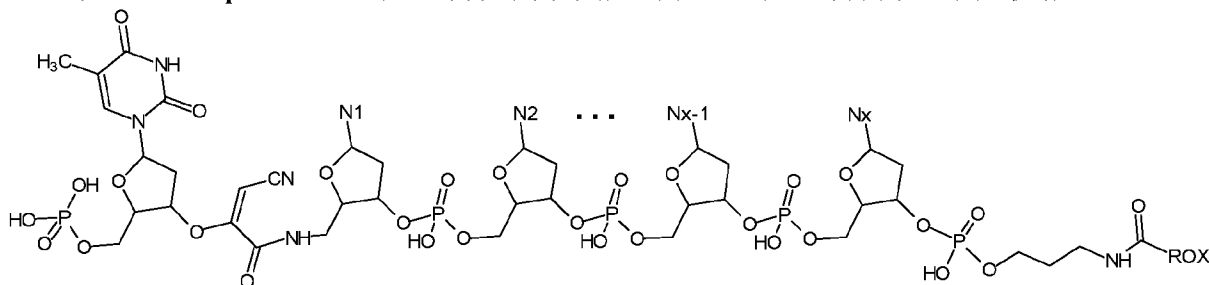
实施例 8: 化学基团 (氰基乙烯) 可逆连接探针 (6 个随机碱基) 的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行，不同之处在于使用 4 组化学基团（氰基乙烯）可逆连接探针，如下：

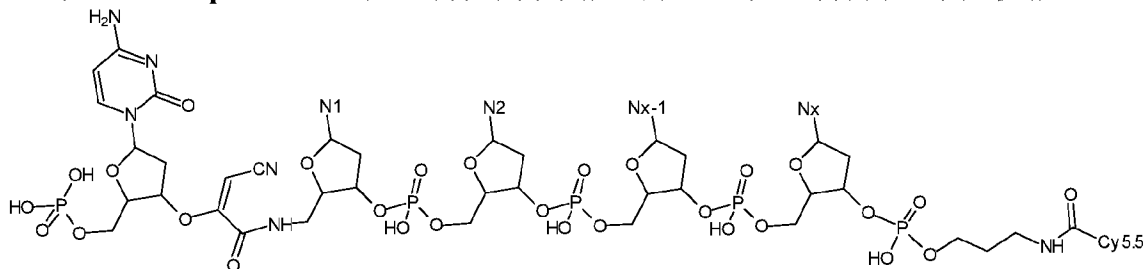
第 1 组 (A probe)：第一部分即测序碱基为 A，第二部分为 6 个随机碱基。



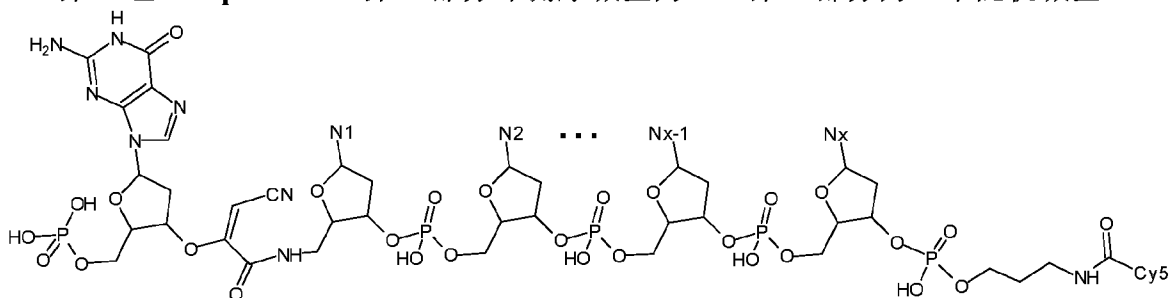
第 2 组 (T probe) : 第一部分即测序碱基为 T, 第二部分为 6 个随机碱基。



第 3 组 (C probe) : 第一部分即测序碱基为 C, 第二部分为 6 个随机碱基。



第 4 组 (G probe) : 第一部分即测序碱基为 G, 第二部分为 6 个随机碱基。

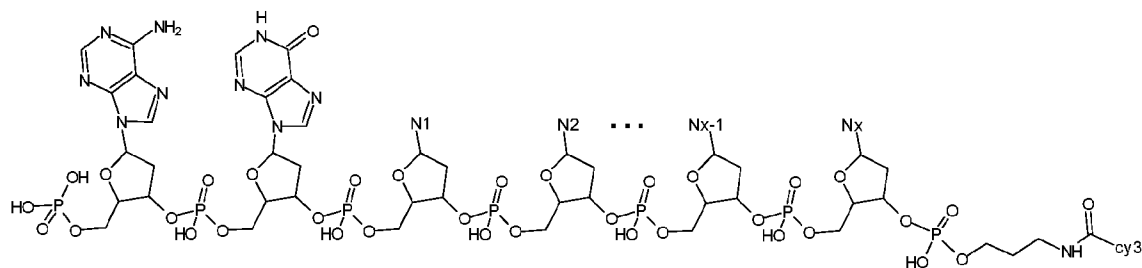


结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致, 说明本发明的测序方法准确。

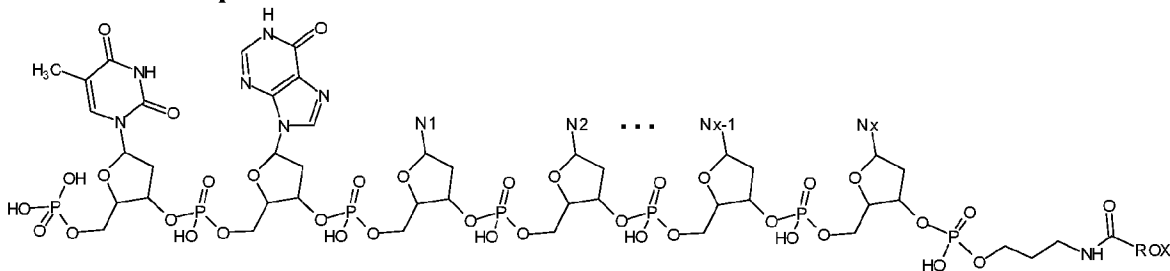
实施例 9: 化学基团 (Inosine) 可逆连接探针 (6 个随机碱基) 的测序应用

按照与实施例 1 相同的方法进行, 不同之处在于使用 4 组化学基团 (Inosine) 可逆连接探针, 如下:

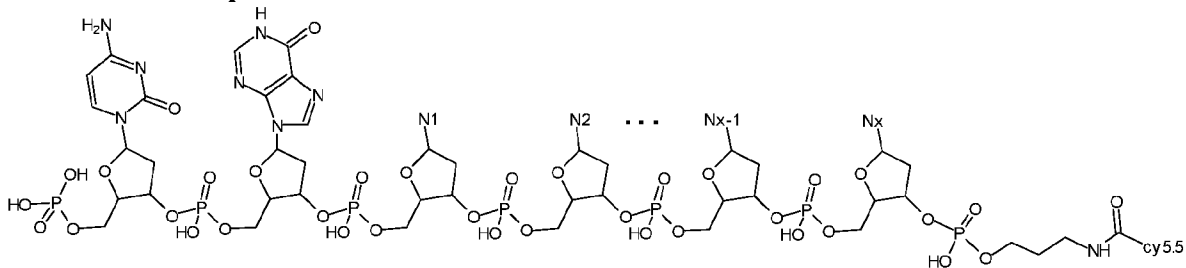
第 1 组 (A probe) : 第一部分即测序碱基为 A, 第二部分为 6 个随机碱基。



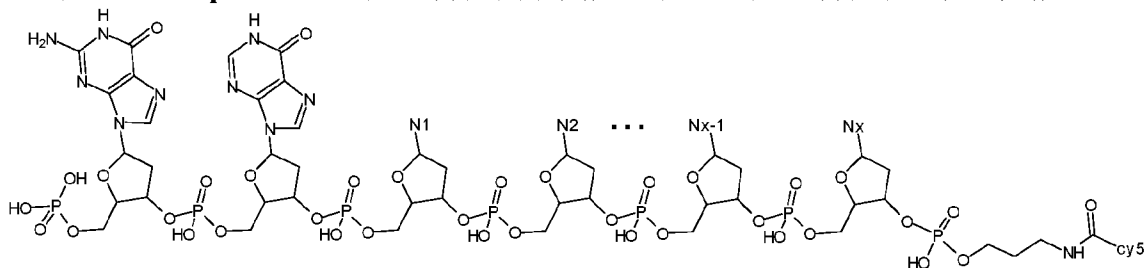
第 2 组 (T probe)：第一部分即测序碱基为 T，第二部分为 6 个随机碱基。



第 3 组 (C probe)：第一部分即测序碱基为 C，第二部分为 6 个随机碱基。



第 4 组 (G probe)：第一部分即测序碱基为 G，第二部分为 6 个随机碱基。



结果与 BGISEQ-500 所携带的标准样品的序列完全一致，说明本发明的测序方法准确。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种核酸探针，包含第一部分、第二部分、连接体和可检测的标记物，其中：

第一部分为碱基 A、T、U、C 或 G，

第二部分为随机碱基和/或通用碱基，并且至少为 3 个碱基，

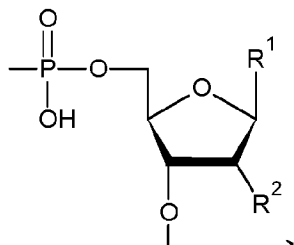
所述第一部分和第二部分通过连接体连接，并且第一部分和连接体之间的连接能够被切断，

所述可检测的标记物连接在第二部分或者连接体上。
2. 根据权利要求 1 所述的核酸探针，其中，所述第一部分位于 5' 端或 3' 端。
3. 根据权利要求 1 所述的核酸探针，其中，所述第二部分的碱基为 3—15 个碱基，优选为 5—12 个碱基，进一步优选为 5—10 个碱基（例如 5、6、7、8、9 或 10 个碱基），特别优选为 6—9 个碱基。
4. 根据权利要求 1 所述的核酸探针，其中，所述可检测的标记物为荧光基团；优选为选自 **cy3**、**cy5**、**Texas Red**、**6-FAM**、**AF532**、**AF647** 和 **AF688** 中的至少一种；

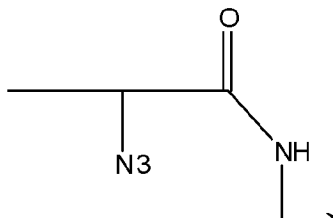
优选地，所述可检测的标记物连接在第二部分；

优选地，所述可检测的标记物连接在第二部分末端的 3'-OH 上；

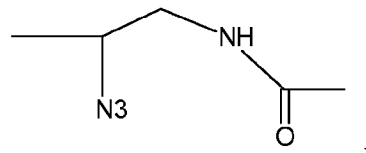
优选地，所述可检测的标记物通过磷酸酯键连接在第二部分末端的 3'-OH 上。
5. 根据权利要求 1 所述的核酸探针，其中，所述连接体不含有硫原子；优选地，所述连接体选自如下的式 IV-式 IX 所示的基团：



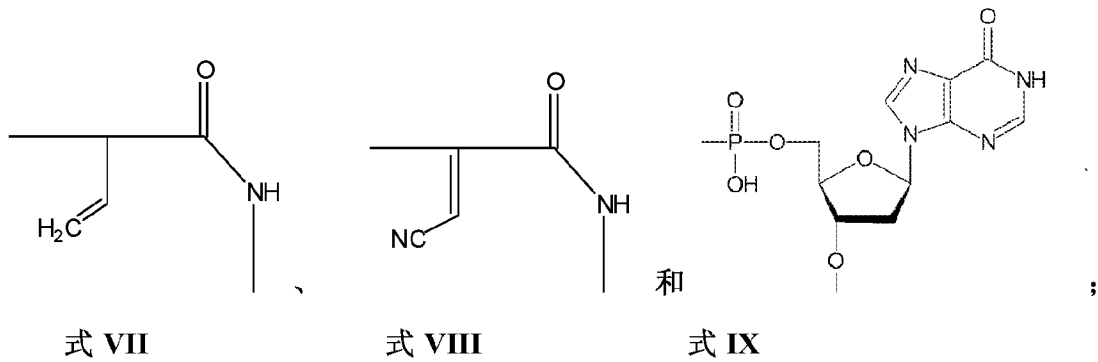
式 IV



式 V



式 VI



其中，式 IV 中， R^1 选自 H、OH、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基； R^2 选自 H、OH、F、Cl 和 Br。

6. 一种核酸探针组合，其包含 4 组探针，其中：

第一组核酸探针：包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 A；

第二组核酸探针：包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 T 或 U；

第三组核酸探针：包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 C；

第四组核酸探针：包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针，其中，第一部分的碱基为 G；

并且所述 4 组核酸探针中的可检测的标记物各不相同；

所述 4 组核酸探针混合或者不混合；

优选地，第一组核酸探针与第四组核酸探针的摩尔数相等；

优选地，第二组核酸探针与第三组核酸探针的摩尔数相等；

优选地，第一组核酸探针与第四组核酸探针的摩尔数之和小于或等于第二组核酸探针与第三组核酸探针的摩尔数之和；

优选地，第一组核酸探针：第二组核酸探针：第三组核酸探针：第四组核酸探针的摩尔比为 (0.5-2) : (3-5) : (3-5) : (0.5-2)；更优选为 1 : 4 : 4 : 1。

7. 一种连接液，其包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针或者包含权利要求 6 所述的核酸探针组合，以及 DNA 连接酶。

8. 根据权利要求 7 所述的连接液，其特征在于如下的 (1) 至 (5) 项中的任意一项或者多项：

(1) 所述 DNA 连接酶为选自 T4 DNA 连接酶、T7 DNA 连接酶和 T3 DNA 连接酶中的一种或多种；

(2) 所述核酸探针的浓度为 $0.1\mu\text{M}$ — $5\mu\text{M}$ ，优选为 $1\mu\text{M}$ ；

(3) 所述 DNA 连接酶的浓度为 $0.01\mu\text{M}$ — $2\mu\text{M}$ ，优选为 $0.5\mu\text{M}$ ；

(4) 还包括如下成分：

$50\text{mM CH}_3\text{COOK}$, 20mM Tris , $10\text{mM Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $100\mu\text{g/ml BSA}$, 1mM ATP , 10% PEG6000；

(5) 所述连接液余量为水。

9. 一种试剂盒，其包含权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针，或者包含权利要求 6 所述的核酸探针组合，或者包含权利要求 7 或 8 所述的连接液；

优选地，还包含选自能够切断第一部分和连接体之间的连接的试剂、用于溶解核酸探针的缓冲液和测序引物中一种或多种；

优选地，所述试剂盒中的试剂不含有银离子。

10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒，其中，能够切断第一部分和连接体之间的连接的试剂为内切酶（例如内切酶 IV 或内切酶 V）、有机膦化物（例如 THPP 或 TCEP）或者 PdCl_2 与磺化三苯基膦配合物的组合物。

11. 一种核酸测序方法，包括下述步骤：

(1) 将测序引物杂交至待测核酸分子；

(2) 将权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针或者权利要求 6 所述的核酸探针组合连接至测序引物；

(3) 洗脱未与待测核酸分子结合的核酸探针；

(4) 检测结合于待测核酸分子的核酸探针上的可检测的标记物，确定第一部分的碱基信息；

(5) 切断核酸探针第一部分与连接体的连接，洗脱核酸探针中除第一部分之外的其余部分；

优选地，还包括下述步骤：

(6) 重复前述步骤 (2) — (4) 或 (2) — (5) 。

12. 根据权利要求 11 所述的测序方法，其中，步骤 (2) 中，通过使用权利要求 7 或 8 所述的连接液，将权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的核酸探针或者权利要求 6 所述的核酸探针组合连接至测序引物。

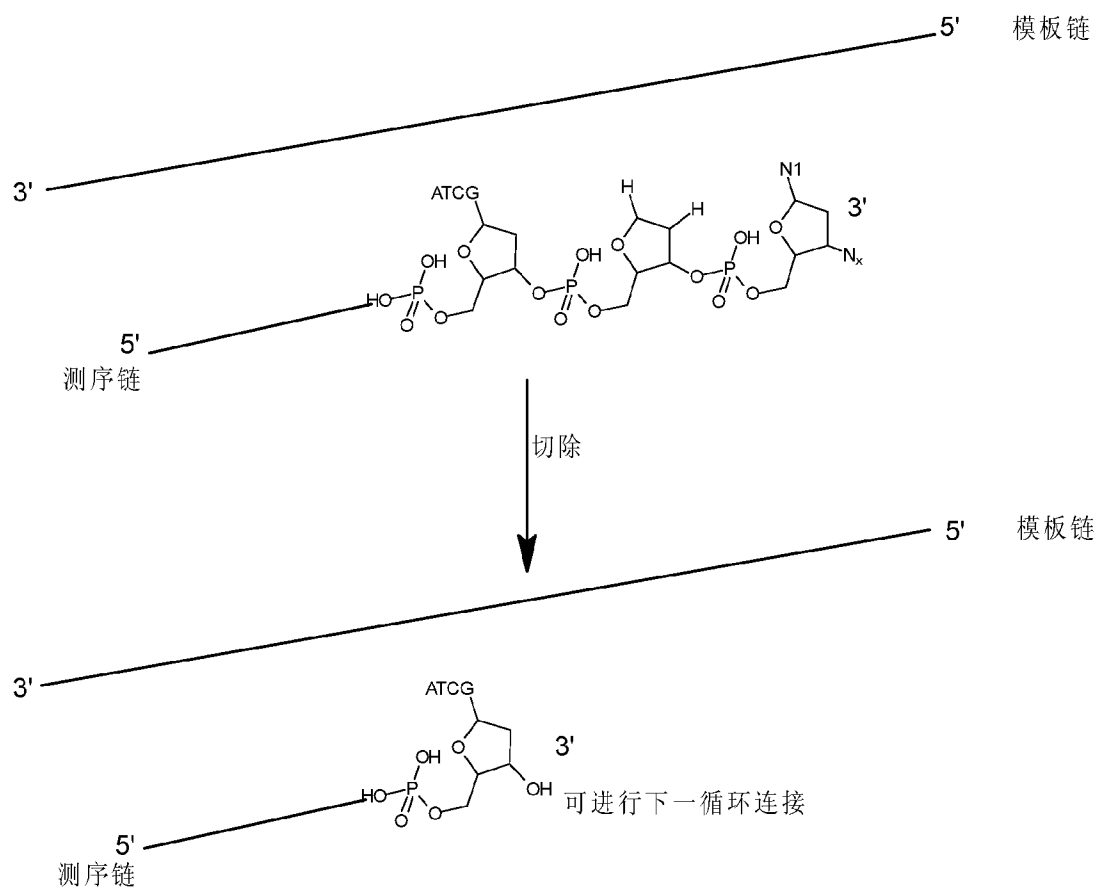


图1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2018.01)i; C07H 21/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/-;C07H 21/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED, ISI Web of Knowledge, PATENTICS, 超星科技数字图书馆, SUPERSTAR DIGITAL LIBRARY, 读秀, DUXIU: 探针, 测序, 边合成边测序, 连接法, SBS, ABI, SOLiD, 随机碱基, 通用碱基, 荧光, 连接体, 连接, 剪切, AP位点, 叠氮, 烯丙基, 氰乙基, 肌酐, 有机磷化物, 钯催化试剂, hAAG酶, inosine, Endonuclease IV, probe, sequenc+, connector, linker, fluoresce +, constant, base, random, azide, cut+, propenyl, cyanovinyl, organophosphorus, palladium

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102030792 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 April 2011 (2011-04-27) claims 1-11, description, paragraphs 4 and 58-63, and figures 1-2	1-12
Y	CN 101633961 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 27 January 2010 (2010-01-27) description, page 3, 5th line from the bottom to page 6, line 13	1-12
Y	JU, J.Y. et al. "Four-color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators" <i>PNAS</i> , Vol. 103, No. (52), 26 December 2006 (2006-12-26), abstract, page 19639, right-hand column, paragraph 2 to page 19640, right-hand column, paragraph 2, and figures 1-5	1-12
Y	ANSORGE, W.J. "Next-generation DNA Sequencing Techniques" <i>New Biotechnology</i> , Vol. 25, No. (4), 30 April 2009 (2009-04-30), abstract, page 197, right-hand column, paragraph 3 to page 198, right-hand column, paragraph 1, and figure 4	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2018

Date of mailing of the international search report

29 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094902

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARDIS, E.R. "The Impact of Next-generation Sequencing Technology on Genetics" <i>Trends in Genetics</i> , Vol. 24, No. (3), 11 February 2008 (2008-02-11), abstract, page 135, left-hand column, paragraph 2 to page 136, right-hand column, paragraph 1, table 2, and figure 3	1-12
A	CN 1617937 A (SOLEXA LIMITED) 18 May 2005 (2005-05-18) entire document	1-12
A	CN 103602719 A (BEIJING MYGENOSTICS CO., LTD.) 26 February 2014 (2014-02-26) entire document	1-12
A	LIU, X.P. et al. "Chlamydia Pneumoniae AP Endonuclease IV Could Cleave AP Sites of Double- and Single-stranded DNA" <i>BBA</i> , Vol. vol. 1753, 06 October 2005 (2005-10-06), pages 217-225	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/094902

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102030792	A	27 April 2011	US	2011076679	A1	31 March 2011
				EP	2305835	A1	06 April 2011
				US	8030466	B2	04 October 2011
				KR	20110034838	A	06 April 2011
				EP	2305835	B1	19 December 2012
				KR	101107315	B1	20 January 2012
				CN	102030792	B	24 September 2014
CN	101633961	A	27 January 2010	CN	101633961	B	02 January 2013
CN	1617937	A	18 May 2005	PT	1451351	T	29 March 2017
				IL	162170	D0	20 November 2005
				US	2006160075	A1	20 July 2006
				US	2006188901	A1	24 August 2006
				EP	2338893	A1	29 June 2011
				CY	1118765	T1	12 July 2017
				KR	20050044668	A	12 May 2005
				BR	0214683	A	23 November 2004
				AU	2002349155	A1	17 June 2003
				CA	2469066	A1	12 June 2003
				EP	1451351	B1	01 February 2017
				IS	7291	A	01 June 2004
				ES	2620131	T3	27 June 2017
				US	7427673	B2	23 September 2008
				JP	2005511058	A	28 April 2005
				US	7057026	B2	06 June 2006
				EP	2338893	B1	28 June 2017
				DK	1451351	T3	27 March 2017
				WO	03048387	A3	16 October 2003
				WO	03048387	A2	12 June 2003
				US	2003104437	A1	05 June 2003
				US	2010028885	A1	04 February 2010
				EP	1451351	A2	01 September 2004
				EP	3266791	A1	10 January 2018
				US	7566537	B2	28 July 2009
				US	7785796	B2	31 August 2010
CN	103602719	A	26 February 2014	CN	103602719	B	08 June 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/094902

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2018.01)i; C07H 21/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q 1/-;C07H 21/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED, ISI Web of Knowledge, PATENTICS, 超星科技数字图书馆, 读秀:探针, 测序, 边合成边测序, 连接法, SBS, ABI, SOLiD, 随机碱基, 通用碱基, 荧光, 连接体, 连接, 剪切, AP位点, 叠氮, 烯丙基, 氰乙基, 肌酐, 有机磷化物, 钯催化试剂, hAAG酶, inosine, Endonuclease IV, probe, sequenc+, connector, linker, fluoresc+, constant, base, random, azide, cut+, propenyl, cyanovinyl, organophosphorus, palladium

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 102030792 A (韩国科学技术研究院) 2011年 4月 27日 (2011 - 04 - 27) 权利要求1-11, 说明书第4、58-63段, 图1-2	1-12
Y	CN 101633961 A (东南大学) 2010年 1月 27日 (2010 - 01 - 27) 说明书第3页倒数第5行至第6页第13行	1-12
Y	JU, J. Y. 等. "Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators" PNAS, 第103卷, 第52期, 2006年 12月 26日 (2006 - 12 - 26), 摘要, 第19639页右栏第2段至第19640页右栏第2段, 图1-5	1-12
Y	ANSORGE, W. J. "Next-generation DNA sequencing techniques" NEW BIOTECHNOLOGY, 第25卷, 第4期, 2009年 4月 30日 (2009 - 04 - 30), 摘要, 第197右栏第3段至第198页右栏第1段, 图4	1-12
Y	MARDIS, E. R. "The impact of next-generation sequencing technology on genetics" TRENDS IN GENETICS, 第24卷, 第3期, 2008年 2月 11日 (2008 - 02 - 11), 摘要, 第135页左栏第2段至第136页右栏第1段, 表2, 图3	1-12

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 9月 12日

国际检索报告邮寄日期

2018年 9月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

沈晶晶

电话号码 86-(10)-53961944

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1617937 A (索雷克萨有限公司) 2005年 5月 18日 (2005 - 05 - 18) 全文	1-12
A	CN 103602719 A (北京迈基诺基因科技有限责任公司) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 全文	1-12
A	LIU, X. P. 等. "Chlamydia pneumoniae AP endonuclease IV could cleave AP sites of double- and single-stranded DNA" BBA, 第1753卷, 2005年 10月 6日 (2005 - 10 - 06), 第217-225页	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/094902

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102030792	A	2011年 4月 27日	US	2011076679	A1	2011年 3月 31日
				EP	2305835	A1	2011年 4月 6日
				US	8030466	B2	2011年 10月 4日
				KR	20110034838	A	2011年 4月 6日
				EP	2305835	B1	2012年 12月 19日
				KR	101107315	B1	2012年 1月 20日
				CN	102030792	B	2014年 9月 24日
CN	101633961	A	2010年 1月 27日	CN	101633961	B	2013年 1月 2日
CN	1617937	A	2005年 5月 18日	PT	1451351	T	2017年 3月 29日
				IL	162170	D0	2005年 11月 20日
				US	2006160075	A1	2006年 7月 20日
				US	2006188901	A1	2006年 8月 24日
				EP	2338893	A1	2011年 6月 29日
				CY	1118765	T1	2017年 7月 12日
				KR	20050044668	A	2005年 5月 12日
				BR	0214683	A	2004年 11月 23日
				AU	2002349155	A1	2003年 6月 17日
				CA	2469066	A1	2003年 6月 12日
				EP	1451351	B1	2017年 2月 1日
				IS	7291	A	2004年 6月 1日
				ES	2620131	T3	2017年 6月 27日
				US	7427673	B2	2008年 9月 23日
				JP	2005511058	A	2005年 4月 28日
				US	7057026	B2	2006年 6月 6日
				EP	2338893	B1	2017年 6月 28日
				DK	1451351	T3	2017年 3月 27日
				WO	03048387	A3	2003年 10月 16日
				WO	03048387	A2	2003年 6月 12日
				US	2003104437	A1	2003年 6月 5日
				US	2010028885	A1	2010年 2月 4日
				EP	1451351	A2	2004年 9月 1日
				EP	3266791	A1	2018年 1月 10日
				US	7566537	B2	2009年 7月 28日
				US	7785796	B2	2010年 8月 31日
CN	103602719	A	2014年 2月 26日	CN	103602719	B	2016年 6月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)